

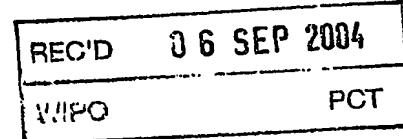
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



DE 04/1210



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 25 638.5

Anmeldetag: 6. Juni 2003

Anmelder/Inhaber: Universität Leipzig, 04109 Leipzig/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft
durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin

IPC: G 01 N 33/53

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. August 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
im Auftrag

Heiß



Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Frühdiagnostik der Schwangerschaft. Es ist die Aufgabe gestellt, unter Verwendung eines zuverlässigen Testkits frühzeitig eine Schwangerschaft zu diagnostizieren. Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung von endometrialem und dezidualem hCG aus Heparin- oder EDTA-Plasma und Serum des Peripherblutes in der späten sekretorischen Zyklusphase oder nach ausgebliebener Regelblutung.

Dafür werden spezifische Antikörper mit dem Epitop zum C-terminalen Ende der β hCG-Untereinheit im Exon 3 oder mit einem Epitop im Exon 2 verwendet, die Aminosäuredifferenzen der β hCG-Untereinheit zwischen der hCG-Bildung im endometrialem und trophoblastären Gewebe erkennen und quantifizieren können.

Es wurde gefunden, daß endometriales β hCG vom Gen $\beta 7$, $\beta 6$ und $\beta 6e$ exprimiert wird, während trophoblastäres β hCG vom Gen $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ gebildet wird. Deshalb kann mit einem endometrium- und deziduaspezifischen e β hCG-Antikörper eine hCG- und/oder β hCG-Bestimmung erfolgen und eine frühzeitige Aussage über eine Schwangerschaft getroffen werden.

Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Frühdiagnostik einer erfolgten Schwangerschaft durch die Bestimmung von humanem endometrialen hCG und/oder β hCG im Serum, Plasma und im Peripherblut der Lutealphase sowie in der frühen Schwangerschaft. Die Freisetzung des endometrialen hCG ist Ausdruck ungestörter sekretorischer Transformation des Endometriums bzw. Ausdruck einer erfolgten Differenzierung zur Dezidua.

Die Erfindung betrifft ferner einen Testkit zur Durchführung des Verfahrens.

Es ist bereits bekannt, das trophoblastäre Gesamt molekül hCG (Total-hCG) allein oder in der Summe mit den freien Untereinheiten zu bestimmen. Dafür sind unterschiedliche Testkits vorgeschlagen worden, die mit unterschiedlicher Spezifität arbeiten (1) und die Bestimmung von holo-hCG (Total-hCG), β hCG und β CG ermöglichen (2). Die Heterogenität des hCG im biologischen Material (intaktes α , β -Heterodimer, freies β CG, freies β hCG, β hCG core-Fragment, nicked hCG, nicked β hCG), bezogen auf die Bindung an den jeweilig verwendeten Antikörper, erschweren die genaue Bestimmung und die Standardisierung eines Nachweisverfahrens für das endometriale hCG (3-5). Eine zusätzliche Heterogenität der hCG-Bestimmung in der späten Lutealphase und frühen Schwangerschaft kann im geringen Grad auch zwischen den vier nativen, hyperglykosylierten oder desialylierten Kohlenhydratseitenketten des C-terminalen Endes (CTP) von β hCG (Aminosäure 113 - 145), wie sie different zwischen früher und mittlerer Schwangerschaft und bei Chorioncarcinom im trophoblastären β hCG beobachtet werden sind, auftreten (4, 6-10).

Weiterhin kann die Variation des Alanin, A (Endometrium, Dezidua) und Aspartat, D (Trophoblast) in der Aminosäureposition 117 des C-terminalen Endes von hCG (β hCG-CTP) bei endometrialem, dezidualem, blastozytärem und trophoblastärem β hCG für die Epitop-Spezifität des verwendeten Antikörpers von Bedeutung sein (11).

Neben der bekannten Änderung der Aminosäuresequenz in Position 117 des CTP vom Exon 3 des β hCG für nicht-trophoblastäres hCG haben wir eine weitere Differenz der Aminosäure bei Position 4 im Exon 2 zwischen Trophoblast und Endometrium finden können (Pro - Met, P - M).

Die bisher etablierten Verfahren haben den Nachteil, keine ausreichende Aussage über die Differenziertheit der exprimierten hCG-Gene treffen zu können. Das hat seine Ursache darin, daß die Verfahren die Heterogenität der vorliegenden β hCG-Epitope aus jeweils endometrialem, trophoblastärem, leukozytärem oder chorioncarcinomähnlichen Ursprung nicht erfassen.

Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Bestimmung von humanem endometrialem hCG und/oder β hCG anzugeben, das eine frühzeitige Diagnose einer erfolgten Schwangerschaft ermöglicht.

Die Erfindung hat folgende Aufgabe zu lösen:

- frühzeitige Diagnostik einer Schwangerschaft in Kombination von endometrialem und trophoblastärem hCG,
- Differenzierung eines early pregnancy loss,
- Differenzierung zwischen Extrauteringravität und intrauteriner Schwangerschaft,

Das Verfahren richtet sich auf die Angabe einer Schrittfolge zur Bestimmung von endometrialem hCG und/oder β hCG (e β hCG), womit die angegebene Zielfunktion erreicht werden kann.

Der Erfindung liegt die wissenschaftlichen Erkenntnisse zugrunde, daß im sekretorischen Endometrium gesunder nichtschwangerer Frauen epitheliales hCG und/oder β hCG gebildet wird (12-15). Auch in der Dezidua wird bei Patientinnen mit Extrauteringravität hCG und/oder β hCG im Drüseneipithel nachgewiesen (16). Der Nachweis erfolgt durch Immunhistochemie, *in situ*-Hybridisierung, Western Blot und RT-PCR..

Nach Sequenzierung wurde von uns nachgewiesen, daß die β -Untereinheit des endometrialen hCG (e β hCG) different zum herkömmlichen trophoblastären hCG (t β hCG) ist, vor allem im Promotorgen des Exon 1 und auch im Exon 3. Das zeigt, daß das e β hCG vom Gen 7 und 6 translatiert wird, während trophoblastäres β hCG vorwiegend vom Gen 5 und auch Gen 8 und 3 gebildet wird.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß das erste in der Frühschwangerschaft nachgewiesene Serum β CG entgegen der allgemeinen Auffassung nicht t β CG sondern e β CG ist. Die Aminosäure- und Nukleotidsequenz des endometrialen β CG wird hier erstmals in SEQ ID No 5 und SEQ ID No 7 dargestellt (Endo). Da die Aminosäure- und Nukleotidsequenz des endometrialen hCG in SEQ ID No 5 und No 7 nicht ausschließlich hCG β 7 oder hCG β 6 ist, bezeichnen wir die endometriale Gensequenz als Gen β 6e.

Die Erfindung vermeidet die Nachteile bisher bekannter Methoden und der zu der Durchführung entwickelten Testkits der Total-hCG/ β hCG-Bestimmung durch den Einsatz des endometrium- und deziduaepithel-spezifischen e β hCG-Antikörpers im Verfahren des Testansatzes.

Es werden spezifische Antikörper mit veränderter Aminosäuresequenz im Exon 2 (Position +4) und Exon 3 (Position +117) entwickelt und eingesetzt, die nur den endometrialen hCG- und/oder β hCG-Anteil im Serum, Plasma und Peripherblut erfassen.

Der Anteil endometrialen hCGs (oder seines β hCG-Anteils) kann durch die Anwendung der beschriebenen Methode mit dem von uns hergestellten spezifischen Antikörper für e β hCG zu hCG anderen Ursprungs differenziert werden, wie zum Beispiel dem trophoblastären hCG (Schwangerschaft). Die Differenz aus den gemessenen hCG-Werten im Peripherblut, das zum Beispiel mit den herkömmlichen total-hCG / β hCG-Immunoassays erfaßt wird, und dem endometrialen hCG im Serum ergibt somit das trophoblastäre hCG. Die Differenz aus dem im Peripherblut gemessenen hCG und dem trophoblastären hCG ergibt das von uns beschriebene e β hCG.

Es ist zu verfahren wie im Patentanspruch 1 dargestellt. Die Erfindung wird nachste-

hend an drei Ausführungsbeispielen näher erläutert, ohne auf diese beschränkt zu sein.

Ausführungsbeispiel 1:

Der Patientin wird zur Diagnostik Peripherblut der mittleren bis späten Sekretionsphase entnommen (Heparinblut, Blut). Das Plasma oder Serum wird bis zur Messung bei -20° C gelagert.

Als Antigenmaterial für die Antikörpergewinnung des endometrialen hCG und/oder β hCG werden zum einen je ein synthetisches Peptid der Aminosäuresequenz 109 - 118 oder 109 - 122 oder sequenzversetzt für das hCG β 7, β 6 und hCG β 5, β 8, β 3 des C-terminalen Endes (CTP) im Exon 3 eingesetzt:

ehCG β 7, β 6, β 6e (AS 109 - 122):

109	110	115	117	120	122								
Thr	- Cys	- Asp	- Asp	- Pro	- Arg	- Phe	- Gln	- Ala	- Ser	- Ser	- Ser	- Ser	- Lys

thCG β 5, β 8, β 3 (AS 109 - 122):

109	110	115	117	120	122								
Thr	- Cys	- Asp	- Asp	- Pro	- Arg	- Phe	- Gln	- Asp	- Ser	- Ser	- Ser	- Ser	- Lys

und weiterhin eine Zell-Linie humaner endometrialer Drüsenepithel-Zellen wie RL95-2 oder eine andere Zell-Linie (humane uterine epitheliale Zell-Linie RL 95-2).

Vor dem Einsatz der endometrialen Epithelzellen wird die mRNA-Expression des hCG β 7, β 6, β 6e im Promotorgen Exon 1 und im Exon 3 (CTP) in den nativen Zellen und nach Kultur mit RT-PCR geprüft und durch Sequenzanalyse bestätigt.

Die monoklonalen Antikörper der CTP-Peptide und der Endometrium-Epithel-Zell-Linie gegen hCG β 7, β 6 werden nach Immunisierung, Isolierung, Hybridisierung und Fein-

reinigung in vorgegebener Vorschrift hergestellt und bei - 20° C gelagert. Dazu werden zunächst sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse mit einer Endometrium-Epithel-Zell-Linie immunisiert. Aus den Milzen derart immunisierter Mäuse werden die Zellen isoliert und mit Mausmyelomzellen fusioniert. Die geeigneten Myelomzellen P3-X63-Ag8.653 (17) werden in RPMI-1640 mit 10 % fetalem Kälberserum gezüchtet. In einem Kulturmedium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (18), werden die gebildeten Hybridzellen von den nicht fusionierten Myelomzellen abgetrennt und Zellklone selektiert, welche Antikörper der gewünschten Spezifität sezernieren. Die Selektierung der Hybridome erfolgt in an sich bekannter Weise, ein besonders produktives Hybridom wird ausgewählt. Die Herstellung von Hybridomen, welche Antikörper der gewünschten Spezifität sezernieren, ist zuverlässig wiederholbar. Eine Hinterlegung ist deshalb nicht erforderlich.

Sandwich-ELISA: Die gereinigten monoklonalen Antikörper (Mab) werden an ELISA-plates (96 wells) adsorbiert (8 µg/ml in PBS, 1 Stunde, 37° C) mit anschließendem Blocken und Waschen; Antigeninkubation (100 µl, 1 Stunde, 37° C) mit hCG und/oder βhCG oder dem synthetischen Peptid hCG β7, β6, β6e als Standardreihe und dem Heparinplasma in Blocking-Puffer; Bestimmung des Sandwich-Mab, gekoppelt an HRP type IV (Sigma) zu 100 µl für 1 Stunde, 37° C nach der Methode von Wilson und Nakane (19).

Peripherblut der Frühschwangerschaft: Es wird als Heparin- oder EDTA-Plasma und im Serum zur Messung mit dem direkten hCG β7, β6, β6e-CTP- ELISA (AS 109 – 118; AS 109-122) bzw. dem hCG β7, β6, β62 (AS -5 bis +5; AS -6 bis +6)-Elisa eingesetzt.

Ausführungsbeispiel 2:

Neben der bekannten Änderung der Aminosäuresequenz in Position 117 des CTP vom Exon 3 des βhCG für nicht-trophoblastäres hCG haben wir eine weitere Differenz der Aminosäure bei Position 4 im Exon 2 zwischen Trophoblast und Endometrium finden können (Pro - Met, P - M).

Alternativ zum Ausführungsbeispiel 1 wird als Antigenmaterial für die Antikörpergewinnung des endometrialen hCG und/oder β hCG zum einen je ein synthetisches Peptid der Aminosäuresequenz - 5 bis + 5 oder sequenzversetzt oder erweitert für das endometriale oder trophoblastäre β hCG neben einer humanen uterinen epithelialen Zell-Linie wie RL 95-2 eingesetzt:

ehCG β 7, β 6, β 6e (AS -6 bis +6):

-6 -5
-1 +1
+4 +5
+6

Met - Gly - Gly - Thr - Trp - Ala - Ser - Lys - Glu - Met - Leu - Arg

thCG $\beta 5, \beta 8, \beta 3$ (AS -6 bis +6):

-6
-5
-1
+1
+4
+5
+6

Met - Gly - Gly - Thr - Trp - Ala - Ser - Lys - Glu - Pro - Leu - Arg

Vor dem Einsatz der endometrialen Epithelzellen wird die mRNA-Expression des hCG $\beta 7, \beta 6$ im Promotorgen Exon 1 und im Exon 2 bei Aminosäureposition +4 in den nativen Zellen und nach Kultur mit RT-PCR geprüft und durch Sequenzanalyse bestätigt.

Die monoklonalen Antikörper werden weiter wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben hergestellt und in den beschriebenen ELISA-Test-Anordnungen eingesetzt. Außerdem besteht die Option in Kombination von Ausführungsbeispiel 1 und Ausführungsbeispiel 2 die gesamte Aminosäuresequenz von -4 bis +122 oder eine Ligation mit beiden angegebenen Aminosäuresequenzen als Antigen für die Antikörpergewinnung zu benutzen (sowohl für Aminosäuresequenz ehCG β 7, β 6 als auch thCG β 5, β 8, β 3).

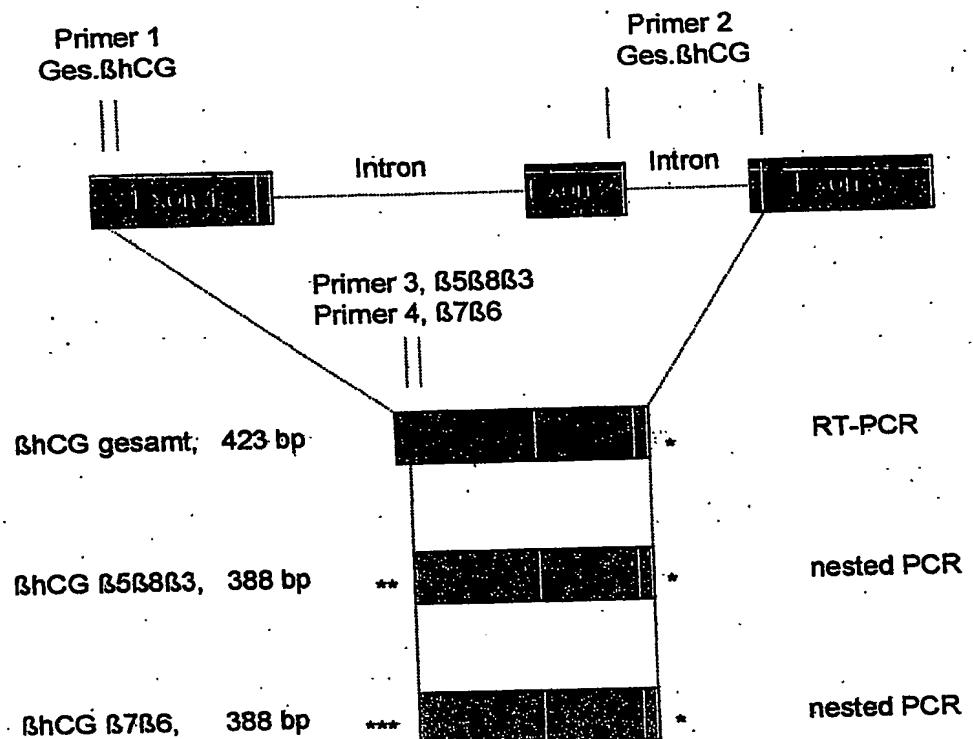
Patentansprüche:

1. *Verfahren* zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft im aktuellen Menstruationszyklus durch Bestimmen von humanem endometrialem resp. dezidualem hCG, dadurch gekennzeichnet, daß der Patientin Peripherblut in der späten Sekretionsphase oder nach ausgebliebener Regelblutung entnommen wird, ein ELISA-Test mit dem von aus einer *Endometrium-Epithel-Zelllinie* und einer Myelomzelllinie P3X63-Ag8.653 erhaltenen Hybridom produzierten monoklonalen Antikörper gegen endometriales hCG vorgenommen wird und die Konzentration des endometrialen hCG absolut oder relativ zum Meßwert in einem zweiten ELISA-Test für übliches trophoblastäres hCG bestimmt wird.
2. *Verfahren* zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen hCG, dadurch gekennzeichnet, daß je ein ELISA-Test mit synthetischen Peptiden von Exon 3 mit AS 109 bis 122, von Exon 2 mit AS -6 bis +6 oder auch von synthetischen Peptiden mit Anteilen innerhalb der Aminosäuresequenz -6 bis +122, in allen Fällen auch sequenzversetzt oder aminosäureverlängert, dargestellt und zur Messung des endometrialen hCG verwendet wird unter Nutzung der Sequenzen SEQ ID No 1 - 5.
3. *Testkit* zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft, bestehend aus einem Enzymimmunoassay zum Bestimmen von humanem endometrialen hCG im Serum/Plasma und einem monoklonalen Antikörper, produziert von einem Hybridom, das aus einer *Endometrium-Epithel-Zell-Linie* und der Myelomzell-Linie P3X63-Ag8.653 erhalten wird.
4. *Testkit* zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft, bestehend aus einem Enzymimmunoassay zum Bestimmen von humanem endometrialen hCG im Serum/Plasma und einem monoklonalen Antikörper, produziert von einem Hybridom, das hergestellt wird durch Immunisierung von sechs bis acht Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäuse mit einer *Endometrium-Epithel-Zell-Linie*, Isolierung der entsprechenden Zellen aus den Milzen der Mäuse und Fusionierung mit einer Mausmyelomzelllinie, Klonierung und Subklonierung der Hybridome und Verwendung eines produktiven Klons, der die monoklonalen Antikörper *in vivo* oder *in vitro* produziert.

8 100-000

M

5. Verwendung des endometrialen und dezidualen Gens hCG β 6e in Verbindung mit hCG β 7, β 6 für die Transkription und Translation des endometrialen β hCG hinsichtlich der Entwicklung von entsprechenden Nukleotid-Primern für RT-PCR und synthetischen Peptid-Antigenen für die Antikörpergewinnung.
6. Aminosäuresequenz hCG β 6e laut SEQ ID No 5 und Gensequenz hCG β 6e laut SEQ ID No 7.



Fluoreszenzmarker: * NED, ** HEX, ***6-FAM

Zitierte Nicht-Patent-Literatur:

- (1) L.A.Cole, *Clin.Chem.*, **43** (1997) 2233-2243
- (2) P.Berger, C.Sturgeon, J.M.Bidart et al., *Tumor Biol.*, **23** (2001) 1-38
- (3) L.A.Cole, *J. Reprod. Med.*, **43** (1998) 3-10
- (4) L.A.Cole, K.M.Rinne, S.Shahabi et al., *Clin. Chem.*, **45** (1999) 313-314
- (5) A.Kardana, M.M.Elliott, M.A.Gawinowicz et al., *Endocrinology*, **129** (1991) 1541-1550
- (6) S.Birken, A.Krichevsky, J.O'Connor et al., *Endocrine*, **10** (1999) 137-144
- (7) A.Krichevsky, S.Birken, J.O'Connor et al., *Endocrinology*, **134** (1994) 1139-1145
- (8) G.Kovalevskaya, S.Birken, T.Kakuma et al., *J. Endocrinol.*, **161** (2000) 99-109
- (9) P.Mock, G.Kovalevskaya, J.F.O'Connor et al., *Hum. Reprod.*, **15** (2000) 2209-2214
- (10) P.Mock, P.Bischof, R.Rivest et al., *Hum. Reprod.*, **13** (1998) 2629-2632
- (11) D.Bellet, V.Lazar, J.Bieche et al., *Cancer Res.*, **57** (1997) 516-523
- (12) H.Alexander, C.Biesold, W.Weber et al., *Zentralbl. Gynäkol.*, **119** (1997) 17-22
- (13) H.Alexander, G.Zimmermann, G.W.Wolkersdörfer et al., *Hum.Reprod. Update*, **4** (1998) 550-559
- (14) H.Alexander, G.Zimmermann, C.Biesold et al., *J.Fertil.Reprod.(SH)*, **2** (1999) 28-37
- (15) G.W.Wolkersdörfer, S.R.Bornstein, G.Zimmermann et al., *Mol.Hum.Reprod.*, **4** (1998) 179-184
- (16) G.Zimmermann, D.Baier, J.Majer et al., *Mol.Hum.Reprod.*, **9** (2003) 81-89
- (17) J.F.Kearney A.Radbruch, B.Liesegang et al., *J.Immunol.*, **123** (1979) 1548-1550
- (18) J.W.Littlefield et al., *Science*, **145** (1964) 709-712
- (19) M.B.Wilson and P.Nakane, in W.Knapp (ed.): *Immunofluorescence and related techniques*, Amsterdam 1978, pp. 215-224

14

Sequenzprotokoll:

SEQ ID NO 1

<110> . Universität Leipzig

<120> Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin

<130> endometriales hCG β 7, β 6, β 6e / C-terminales Ende CTP / AS 109 -122

<160> 7

<210> 1

<211> 14

<212> Peptid

<213> β hCG endometrial, CTP, Exon 3

<220>

<221>

<300>

<301>

<302>

<303>

. <304>

<305>

<306>

<307>

<308>

<400>

SEQ ID NO 2

<110> Universität Leipzig

<120> Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin

<130> trophoblastäres hCG β 5, β 8, β 3 / C-terminales Ende CTP / AS 109 - 122

<160> 7

<210> 2

<211> 14

<212> Peptid

<213> β hCG trophoblastär, CTP, Exon 3

<220>

<221>

<300>

<301>

<302>

<303>

<304>

<305>

<306>

<307>

<308>

<400> 2 (thCG β 5, β 8, β 3; Aminosäure 109 - 122)

1

5

10

14

Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys

SEQ ID NO 3

<110> Universität Leipzig

<120> Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin

<130> endometriales hCG β 7, β 6, β 6e / AS -6 bis +6

<160> 7

<210> 3

<211> 12

<212> Peptid

<213> β hCG endometrial, Exon 2

<220>

<221>

<300>

<301>

<302>

<303>

<304>

<305>

<306>

<307>

<308>

<400> 3 (ehCG β 7, β 6, β 6e; Aminosäure -6 bis +6)

1 5 10 12

Met Gly Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Met Leu Arg

17
SEQ ID NO 4

<110> Universität Leipzig
<120> Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin

<130> trophoblastäres hCG β 5, β 8, β 3 / AS -6 bis +6
<160> 7
<210> 4
<211> 12
<212> Peptid
<213> β hCG trophoblastär, Exon 2
<220>
<221>
<300>
<301>
<302>
<303>
<304>
<305>
<306>
<307>
<308>
<400> 4 (thCG β 5, β 8, β 3; Aminosäure -6 bis +6)

1 5 10 12

Met Gly Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Pro Leu Arg

SEQ ID No 5

<110> Universität Leipzig
<120> Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin
<130>
<160> 7
<210> 5
<211> 165
<212> Peptid
<213> β hCG β 6e (e β hCG Endo, Endometrium)
<220>
<221>
<300>
<301>
<302>
<400> 5 (β hCG β 6e, Aminosäure-Sequenz des Gens im Endometrium)

16.02.1982
13
SEQ ID No 6

<110> Universität Leipzig
<120> Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin
<130>
<160> 7
<210> 6
<211> 165
<212> Peptid
<213> β hCG β 5, β 8, β 3 (t β hCG, Trophoblast)
<220>
<221>
<300>
<301>
<302>
<400> 6 (β hCG β 5, β 8, β 3, Aminosäure-Sequenz des Gens im Trophoblast)

-20
Met
-15 -10 -5
Glu Met Phe Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly
-1 +1 5 10
Gly Thr Trp Ala ... Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys Arg
15 20 25
Pro Ile Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val
30 35 40
Cys Ile Thr Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr
45 50 55
Met Met Arg Val Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val
60 65 70
Val Cys Asn Tyr Arg Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro
75 80 85
Gly Cys Pro Arg Gly Val Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala
90 95 100
Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys
105 110 115
Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe
120 125 130
Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser
135 140 145
Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

SEQ ID No 7

<110> Universität Leipzig

<120> Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropins

<130>

<160> 7

<210> 7

<211> 861

<212> DNA

<213> β hCG β 6e (e β hCG Endo, Endometrium)

<221>

<301>

<302>

<303>

<304>

<305>

<306>

<307>

<308>

<400> 7 (β hCG β 6e, Sequenz des Gens im Endometrium)

agcactttcc	tcgggtcacg	gcctccctct	ggttcccaag	accccaccat	aggcagaggc	60
aggccttcct	acaccctact	ctctgtgcct	ccagcctcga	ctagtcctca	gcactcgacg	120
actgagtctc	agaggtcact	tcaccgtgg	ctccgcctca	tccttggcgc	tagaccactg	180
aggggagagg	actgggggtgc	tccgctgagc	cactectgtg	cctccctggc	tttgtctact	240
tctcggggcc	cgaagggtta	gtgtccagct	cactccagca	tectacaacc	tccttggcggc	300
cttgccggcc	ccacaaaacc	gaggatataaa	gccaggtaca	ccaggcaggg	gacgcaccaa	360
ggatggagat	gttccagggg	ctgtgtctgt	tgctgtctgt	gagcatgggc	gggacatggg	420
catccaaagga	gatgttccgg	ccacgggtgc	gccccatcaaa	tgccaccctg	gttgtggaga	480
aggagggctg	ccqcggtgtc	atcaccgtca	acaccaccat	ctgtgccggc	tactggccca	540
ccatgaccgg	cgtgtgtca	ggggcctgtc	cgcccctgcc	tcaggtgggt	tgcaactacc	600
gcatgtgtcg	tttcgagtc	atccggctcc	ctggctgtccc	gcccggcgtg	aaccgggtgg	660
tctcctacgc	cgtggctctc	agctgtcaat	gtgcactctg	ccggccgcagc	accactgact	720
gggggggtcc	caaggaccac	cccttgcact	gtgtatgaccc	ccgttccag	gcctcccttt	780
cctcaaaggc	ccctcccccc	agcattccaa	gtccatcccc	actccccggg	ccctcgacca	840
ccccgatcct	ccccacaataa	a				861

Universitätsfrauenklinik der Universität Leipzig
Forschungslabor Humane Reproduktion und Endokrinologie

Transkriptionsstart BhCG

**

LH4	G	**	C	T	C												
CG5	CTT	CAA	TCC	AGC	ACT	TTG	CTC	GGG	TCA	CGG	CCT	CCT	CCT	GGC	TCC		
CG6	CTT	CAG	TCC	AGC	ACT	TTC	CTC	GGG	TCA	CGG	CCT	CCT	CCT	GGT	TCC		
CG7	CTT	CAG	TCC	AGC	ACT	TTC	CTC	GGG	TCA	CGG	CCT	CCT	CCT	GGT	TCC		
Endo															CCT	GGT	TCC

-360

-330

LH4	A	A	T	C	T	C														
CG5	CAG	GAC	CCC	ACC	ATA	GGC	AGA	GGC	AGG	CCT	TCC	TAC	ACC	CTA	CTC	CCT	GTG	CCT	CCA	GGC
CG6	CAA	GAC	CCC	ACC	ATA	GGC	AGA	GGC	AGG	CCT	TCC	TAC	ACC	CTA	CTC	TCT	GTG	CCT	CCA	GCC
CG7	CAA	GAC	CCC	ACC	ATA	GGC	AGA	GGC	AGG	CCT	TCC	TAC	ACC	CTA	CTC	TCT	GTG	CCT	CCA	GCC
Endo	CAA	GAC	CCC	ACC	ATA	GGC	AGA	GGC	AGG	CCT	TCC	TAC	ACC	CTA	CTC	TCT	GTG	CCT	CCA	GCC

-300

-270

LH4	G	A	T	Primer 1	T																		
CG5	TCG	ACT	AGT	CCC	TAG	CAC	TCG	ACG	ACT	GAG	TCT	CTG	AGG	TCG	ACT	AGT	CCC	TAG	GAC	CTG	AGG	TCT	CGC
CG6	TCG	ACT	AGT	CCC	TAA	CAC	TCG	ACG	ACT	GAG	TCT	CAG	AGG	TCA	CTT	CAC	CGT	GGT	CTC	CGC			
CG7	TCG	ACT	AGT	CCC	TAG	CAC	TCG	ACG	ACT	GAG	TCT	CAG	AGG	TCA	CTT	CAC	CGT	GGT	CTC	CGC			
Endo	TCG	ACT	AGT	CCC	TAG	CAC	TCG	ACG	ACT	GAG	TCT	CAG	AGG	TCA	CTT	CAC	CGT	GGT	CTC	CGC			

-240

-210

LH4	C	TC	A	C	G	Primer 3	G	C	A											
CG5	CTC	ACC	CTT	GGC	GCT	TCG	ACT	AGT	CCC	GGC	GCT	CCG	CTG	AGC	CAC	TCC				
CG6	CTC	ATC	CTT	GGC	GCT	AGA	CCA	CTG	AGG	GGA	GAG	GAC	TGG	GGT	GCT	CCG	CTG	AGC	CAC	TCC
CG7	CTC	ATC	CTT	GGC	GCT	TCG	ACT	AGT	CCC	GGC	GCT	CCG	CTG	AGC	CAC	TCC				
Endo	CTC	ATC	CTT	GGC	GCT	AGA	CCA	CTG	AGG	GGA	GAG	GAC	TGG	GGT	GCT	CCG	CTG	AGC	CAC	TCC

-180 Primer 4

-150

LH4	C	T	A	G	C	C	G	A	C	G	T	C								
CG5	TGC	GCC	CCC	CTG	GCC	TTG	TCT	ACC	TCT	TG-	CCC	CCG	AAG	GGT	TAG	TGT	CGA	GCT	CAC	CCC
CG6	TGT	GCC	TCC	CTG	GCC	TTG	TCT	ACT	TCT	CGC	CCC	CCG	AAG	GGT	TAG	TGT	CGA	GCT	CAC	TCC
CG7	TGT	GCC	TCC	CTG	GCC	TTG	TCT	ACT	TCT	CGC	CCC	CCG	AAG	GGT	TAG	TGT	CCA	GCT	CAC	TCC
Endo	TGT	GCC	TCC	CTG	GCC	TTG	TCT	ACT	TCT	CGC	CCC	CCG	AAG	GGT	TAG	TGT	CCA	GCT	CAC	TCC

-120

-90

LH4	G	TC	C	TA	TA															
CG5	AG-	CAT	CCT	ACA	ACC	TCC	TGG	TGG	CCT	TGC	CGC	CCC	CAC	AAC	CCC	GAG	GTA	TAA	AGC	CAG
CG6	AG-	CAT	CCT	ACA	ACC	TCC	TGG	TGG	CCT	TGC	CGC	CCC	CAC	AAC	CCC	GAG	GTA	TGA	AGC	CAG
CG7	AG-	CAT	CCT	ACA	ACC	TCC	TGG	TGG	CCT	TGA	CGC	CCC	CAC	AAA	CCC	GAG	GTA	TAA	AGC	CAG
Endo	AG-	CAT	CCT	ACA	ACC	TCC	TGG	TGG	CCT	TGC	CGC	CCC	CAC	AAA	CCC	GAG	GTA	TAA	AGC	CAG

-60

-30

LH																				
HCG																				
LH4	A	G	T																	
CG5	GTA	CAC	CAG	GCA	GGG	GAC	GCA	CCA	AGG	ATG	GAG	ATG	TTC	CAG	GTA	AGA	CTG	CAG
CG6	GTA	CAC	CAG	GCA	GGG	GAC	GCA	CCA	AGG	ATG	GAG	ATG	TTC	CAG						
CG7	GTA	CAC	CAG	GCA	GGG	GAC	GCA	CCA	AGG	ATG	GAG	ATG	TTC	CAG						
Endo	GTA	CAC	CAG	GCA	GGG	GAC	GCA	CCA	AGG	ATG	GAG	ATG	TTC	CAG						

-1 +1

+15

	1	4	10	20
LH	arg	trp	his	ile
hCG	ser lys glu pro leu arg pro arg cys arg pro ile asn ala thr leu ala val glu lys			
hCG	G CCG	T A		T
CG5	TCC <u>AAG</u> GAG CCG CTT CGG CCA <u>CGG</u> TGC <u>CGC</u> CCC ATC AAT GCC <u>ACC</u> CTG GCT GTG GAG AAG			
CG6	A CCA	C G		C
CG7	A ATG	C G		C
Endo	TCC <u>AAG</u> GAG ATG CTT CGG CCA CGG TGC <u>CGC</u> CCC ATC AAT GCC <u>ACC</u> CTG GCT GTG GAG AAG			
	met	+90		+120

21	30	40
LH		Primer 2
hCG	glu gly cys pro val cys ile thr val asn thr thr ile cys ala gly tyr cys pro thr	
LH4		
CG5	GAG GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC ACC ACC ATC TGT GCC GGC TAC TGC CCC	TGC
CG6		
CG7		
Endo	GAG GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC ACC ACC ATC TGT GCC GGC TAC TGC CCC ACC	
	+150	+180

41	42		
LH	met *** *** *** *** *** *** ***	Intron	*** *** *** *** *** *** *** ***
hCG	met	thr	
lh4		TG	
CG5	ATG GIG AGC TGC CCG GGG CCG	CCC CAC TCA CAC GGC TTC CAG ATG	
CG6	CC		
CG7	CC		
Endo ATG	ACC		
+183	+186		

		50			60
LH	Primer 2	ala	pro		thr
hCG	arg val leu gln gly val leu pro	ala leu pro gln val val cys	asn tyr arg asp val		
LH4	C	C		C	
CG5	GGG GTC CTG CCG GGG GTC CTG CCG	GCC CTG CCT CAG GTG GTG TGC	AAC TAC CGC GAT GTG		
CG6	G	G		A	
CG7	G	G		A	
Endo	CGC GTG CTG CAG GGG GTC CTG CCG	GCC CTG CCT CAG GTG GTG TGC	AAC TAC CGC GAT GTG		
	+210			+240	

70

80

LH		asp		phe
hCG	arg phe glu ser ile arg leu pro gly cys pro arg gly val	asn pro val val ser	tyr	
LH4		T	G	T
CG5	CGC TTC GAG TCC ATC CGG CTC CCT GGC TGC CCG CGC	GGC GTG AAC CCC GTG GTC TCC TAC		
CG6		C	A	
CG7		C	A	
Endo	CGC TTC GAG TCC ATC CGG CTC CCT GGC TGC CCG CGC	GGC GTG AAC CCC GTG GTC TCC TAC		
	+270			+300

90

LH	pro	arg	pro	ser
hCG	ala val ala leu ser cys	gln cys ala leu cys	arg arg ser thr	thr asp cys gly gly
		GC	G C	T T
LH4	C T			
CG5	GCC GTG GCT CTC AGC TGT	CAA TGT GCA CTC TGC CGC CGC	AGC ACC ACT GAC TGC GGG GGT	
CG6	G C	AA C		A C
CG7	G C	AA C		A C
Endo	GCC GTG GCT CTC AGC TGT CAA TGT GCA CTC TGC CGC CGC AGC ACC ACT GAC TGC GGG GGT			

+330

100

110

LH	his	glu leu ser gly leu leu phe leu ser	
hCG	pro lys asp his pro leu thr cys asp asp pro	arg phe gln asp ser ser ser lys	
		C C	
LH4	A	CAAC TCT CAG GCC TCC TCT TCC TCT AAA	
CG5	CCC AAG GAC CAC CCC TTG ACC TGT GAT GAC CCC CG-C TTC CAG GAC TCC TCT TCC TCA AAG		
CG6	G	T G	C
CG7	G	T G	C
Endo	CCC AAG GAC CAC CCC TTG ACC TGT GAT GAC CCC CG C TTC CAG GCC TCC TCT TCC TCA AAG		

+390

117

120

ala. +420

130

hCG	ala pro pro pro ser leu pro ser pro ser arg leu pro gly pro ser asp thr pro ile
LH4	A
CG5	GCC CCT CCC CCC AGC CTT CCA AGT CCA TCC CGA CTC CCG GGG CCC TCG GAC ACC CCG ATC
CG6	C
CG7	C
Endo	GCC CCT CCC CCC AGC CTT CCA AGT CCA TCC CGA CTC CCG GGG CCC TCG GAC ACC CCG ATC

+450

140

+480

145

hCG	leu pro gln ter
LH4	
CG5	CTC CCA CAA TAAA
CG6	
CG7	
Endo	CTC CCA CAA

+495

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.